

24
Feje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTO SINERGICO "IN VITRO" ENTRE AMIKACINA
Y CARBENICILINA FRENTE A CEPAS DE Pseudomonas
aeruginosa AISLADAS DE PACIENTES DEL HOSPITAL
DE PEDIATRIA DEL C.M.N. SIGLO XXI.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

DANIEL GONZALEZ RIVERA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

México, D.F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A dios nuestro señor por ser siempre mi mejor amigo.

A mis Padres:

URSULA Y LAZARO

Por que desde que naci me han enseñado a amar, disfrutar y luchar en la vida.

A mis Hermanos:

Por los buenos momentos que hemos pasado juntos y por permitirme ser su voto de confianza.

A mi Esposa:

Por ser amiga y compañera ideal que siempre me brinda amor y palabras de aliento despertando día a día nuevas iluciones.

A mi Bebe:

Por todo el sentimiento de amor y lucha que ha despertado en mi así como un motivo más de amor entre Adriana y Yo.

A mis Compañeros y Profesores:
Por disfrutarlos y permitirme
aprender nuevas experiencias.

A Lourdes:
Por su ejemplo como persona y
profesional, así como tener su
amistad.

A mis Suegros y Cuñados:
Por ser una familia que me
respeta y me quiere como uno
de ustedes.

El presente TRABAJO DE INVESTIGACION, fué realizado en las instalaciones del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo "XXI", en la - sección de Microbiología I.M.S.S., con la asesoría:

E X T E R N A

Q.B.P. Ma. Luisa Briseño Delgado
Profesor Titular de Microbiología

I N T E R N A

Q.F.B. Ma. de Lourdes González Tejeda
Jefe de Servicio de Microbiología
U.M.F. No. 8

T E O R I C A

Dr. Fortino Solorzano
Jefe de Infectología
Hosp. de Ped. C.M.N. Siglo "XXI"

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| TERAPIA ANTIMICROBIANA | 5 |
| TERAPIA COMBINADA | 10 |
| SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA | 14 |
| FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA | 17 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 19 |
| OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS | 20 |
| HIPOTESIS | 21 |
| MATERIAL | 22 |
| METODO | 24 |
| RESULTADOS | 29 |
| TABLERO DE AJEDREZ | 30 |
| GRAFICAS DE RESISTENCIA | 32 |
| ISOBOLOGRAMAS | 34 |
| CONCENTRACION FACTORIAL INHIBITORIA | 42 |
| DISCUSION DE RESULTADOS | 43 |
| CONCLUSIONES | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 47 |

INTRODUCCION

La Pseudomonas aeruginosa es un bacilo aerobio gramnegativo que pertenece a la familia Pseudomonadaceae. Tiene forma de bastón con un promedio de 0.5-0.8 X 1.5-3 μ . Se presenta aislada, en pares o en cadenas cortas. Es móvil, con flagelos monótricos polares. Produce pigmentos fluorescentes difusibles incluyendo pioverdina y un pigmento soluble de fenacina, denominado piocianina; este último, producido por algo más de la mitad de las cepas clínicas, aparece de color verde o azul con un pH neutro o alcalino y es el origen del nombre aeruginosa.

La Pseudomonas aeruginosa crece en forma óptima a 37°C, y también a 42°C pero no a 4°C. La identificación en el laboratorio de microbiología clínica es relativamente simple, ya que la crece fácilmente en una amplia variedad de medios de cultivo y las características mínimas necesarias para la identificación son pocas. Es un bacilo gramnegativo, recto o levemente curvo, móvil y que no esporula. Crece solo en forma aerobia y no fermenta hidratos de carbono. Oxida azúcares como glucosa y xilosa, pero no maltosa. Es positiva para indol, oxidasa, citrato de Simmons y L-arginina dehidrolasa. Produce gas a partir de nitratos y crece en caldo con infusión cerebro corazón a 42°C. Es negativa para L-lisina descarboxilasa y

L-ornitina descarboxilasa; y no produce sulfuro de hidrógeno o espuma negra en agar hierro de Kligler.

(1,2,3)

Sobre la base de estas y otras características bioquímicas, la Pseudomonas aeruginosa puede ser identificada en forma presuntiva por medio de cierto número de sistemas automatizados y computadorizados para la identificación de bacterias gramnegativas. La P. aeruginosa tiene una distribución cosmopólita. Se aísla de suelos, agua plantas y animales, incluyendo al hombre.

La epidemiología de la Pseudomonas aeruginosa refleja su predilección por un ambiente húmedo. Esto es evidente en su habitat natural, donde está estrechamente relacionada con suelos y agua. Su identificación en plantas está en función de la cantidad de agua. Así mismo la colonización humana ocurre en sitios húmedos como el perineo, axilas y oídos. De tal manera es un factor crítico en reservorios hospitalarios de Pseudomonas aeruginosa, como equipos de ventilación mecánica, soluciones de limpieza, medicamentos, desinfectantes, fregaderos, estropajos, mezcladores de alimentos, vegetales, etc..

Algunas veces esta presente como parte de la flora microbiana normal del hombre. La patogenia de las infecciones por este microorganismo debe comprenderse en el contexto de su existencia como un patógeno oportunista.

La Pseudomonas aeruginosa es el cuarto patógeno nosocomial más frecuente aislado, siendo responsable del 9.9% de todas las enfermedades adquiridas en hospitales. Es la segunda causa principal de neumonía nosocomial, la tercera causa más común de infecciones urinarias (11.7%) y la cuarta causa principal de infección de incisiones quirúrgicas(7.4%), es la cuarta causa más común de bacteremia por gramnegativos y la asociada con la mayor mortalidad.

(1,3,8,10)

La Pseudomonas aeruginosa es invasora y toxigénica. Un hecho que puede explicar la variedad de patologías y síndromes con la cual se le identifica. Puede considerarse que las infecciones por Pseudomonas tienen tres estadios diferentes: unión y colonización bacterianas, invasión local, diseminación y enfermedad sistémica.

(2,3,4)

Los pacientes con enfermedades metabólicas, hematológicas o malignas tienen cierta predisposición a la infección por P. aeruginosa. También los pacientes tienen mayor sensibilidad a la infecciones con este microorganismo después de un tratamiento prolongado con agentes inmunosupresores, corticosteroides, antimetabolitos, antibióticos y radiaciones; muy a menudo esta bacteria contamina las heridas quirúrgicas, úlceras de decúbito, abscesos, quemaduras, en drenajes sinusales, infecciones del oído etc.. Los agentes etiológicos primarios de estas infecciones son eliminados con la antibióticoterapia; a partir de estos puntos, la bacteria puede extenderse fácilmente a otros; actuando como foco

primario. Esta bacteria, adquiere cada día mayor importancia
clínica, como resultado a su resistencia a distintos

a n t i b i ó t i c o s .

TERAPIA ANTIMICROBIANA

Cuando se elige el agente antimicrobiano adecuado para la terapia de una infección dada, deben tenerse en cuenta varios factores importantes. Primero, debe conocerse la identidad del microorganismo infectante o por lo menos, debe ser posible llegar a una presunción estadística razonable con respecto a su identidad sobre la información clínica. Segundo, debemos tener la mayor información posible acerca de la sensibilidad a los antimicrobianos del microorganismo infectante. Tercero, tener suficiente información de las propiedades clínicas farmacológicas como son la toxicidad, unión a proteínas, distribución, absorción y excreción de los posibles antibióticos principales como primera opción a utilizar contra la infección. Finalmente, deben considerarse una serie de factores del huésped para llegar a su elección óptima.

Los antibióticos beta-lactámicos (Carbenicilina) producen ciertos efectos morfológicos característicos sobre las bacterias y éstas probablemente estén relacionadas con las proteínas ligadoras de penicilina particulares, que están más afectadas. Estos cambios dependen del antibiótico, de su concentración y del microorganismo. Este tipo de antibióticos ataca a las bacterias por su primer contacto con ellas: su pared celular. En general, con las menores concentraciones efectivas de un antibiótico beta-lactámico (Carbenicilina), la división celular se inhibe, pero la elongación continúa.

Al aumentar la concentración del antibiótico el crecimiento se inhibe, pero pueden formarse engrosamientos y se observa la lisis bacteriana, estudios muy completos han demostrado que el B-láctámico actúa inhibiendo la formación de uniones transversales peptídicas en la etapa final de la síntesis de la pared celular.

La Carbenicilina es un antimicrobiano derivado del ácido 6-amino-penicilánico. Su principal ventaja es que cura a menudo infecciones serias causadas por especies resistentes a la ampicilina, y otras especies de gramnegativos. Este antibiótico solo se puede administrar por vía parenteral de allí su especial cuidado en el manejo de dosis contra alguna infección. Las reacciones de hipersensibilidad son con mucho los efectos más comunes por las penicilinas, y éstos agentes son probablemente la causa más común de las alergias por antibióticos. La frecuencia total de estas reacciones a las penicilinas varía deL 0.7% AL 10%.

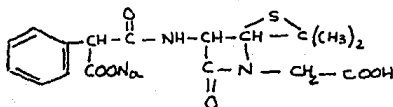
(2,4,5)

Cuando se expone un cultivo de bacterias a una alta concentración de B-lactámico, unos pocos microorganismos llamados resistentes suelen sobrevivir. Pruebas recientes han proporcionado una explicación además de la dependiente de los factores genéticos de las bacterias, esto es, para que la pared celular crezca, es necesario que se haga primero una grieta en la pared de forma que pueda introducirse nuevo material para la construcción. Las grietas son hechas por

enzimas denominadas mucopeptidohidrolasas y en fecha reciente se ha demostrado que los B-lactámicos inhibe estas enzimas y también la enzima transpeptidasa que cataliza la formación de puentes transversales en la etapa final de la formación de la pared celular.

En un cultivo de multiplicación intensa, la mayor parte de las células se encontraran ya en proceso de extensión de la pared celular y serán lizadas por el B-lactámico. Sin embargo, unas pocas pueden tener temporalmente completa la pared celular, porque hayan terminado su desarrollo o no hayan comenzado su crecimiento. Estas células, las persistentes, se congelaran en este estado por inhibición de sus mucopeptidohidrolasas.

(5)



Carbenicilina

Con respecto a los aminoglucósidos (Amikacina) ejercen una rápida acción bactericida. Aunque existe un amplio caudal de información acerca del mecanismo de acción de estos agentes sobre las bacterias, el principal sitio de acción intracelular de los aminoglucósidos (Amikacina) esencialmente es en los ribosomas de la bacteria.

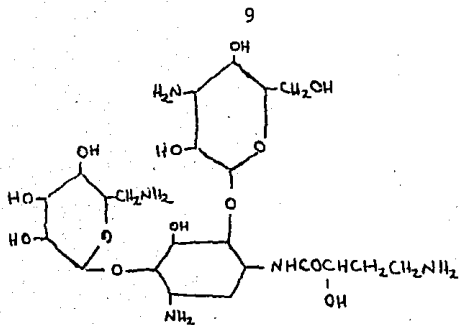
Estos antibióticos (Amikacina) quiebran el ciclo normal de la función ribosomal interfiriendo, al menos en parte, en el primer paso de la síntesis de proteínas que se produce en el ribosoma, la cual daría lugar a la iniciación de la división celular bacteriana.

La mayor parte de los antibioticos que inhiben la síntesis de proteínas interfieren en las funciones de los ribosomas. Algunos inhiben el crecimiento de una amplia variedad de bacterias, distinguiendo el tipo de subunidad ribosomal al que atacaran, ello explica los grados de toxicidad, porque su selectividad de acción no es absoluta.

Todos los aminoglucósidos (Amikacina) tienen el potencial para producir una de toxicidad alta. Dentro de los posible daños tóxicos de un administración alta de éste antibiótico se pueden numerar la ototoxicidad, nefrotoxicidad entre otros, los cuales son irremediamente irreversibles.

(3,4,5)

La Amikacina es un derivado semisintético de la Kanamicina, su toxicidad es directamente contra los riñones y el aparato vestibular y puede causar reacciones de hipersensibilidad. Aumenta la actividad de los bloqueadores neuromusculares no despolarizantes. Varias especies de microorganismos, incluyendo los comensales y patógenos del intestino, desarrollan rápidamente resistencia bacteriana.



Amikacina

TERAPIA COMBINADA

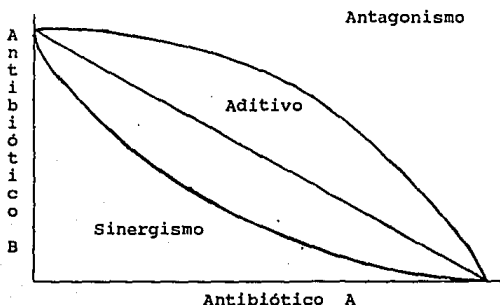
La mayoría de las infecciones del ser humano pueden ser tratadas con un solo agente antimicrobiano, pero existen indicaciones claras para el uso de combinaciones de antibióticos. Dado que las combinaciones proporcionan un mayor espectro de acción que los agentes individuales, a menudo se prefiere usar como tratamiento en las infecciones debido a la sensación de seguridad que proporcionan, aún en las situaciones en las cuales no están indicadas.

Un método cuantitativo para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los antibióticos en combinación es probar múltiples mezclas de estos, expresando los resultados en una gráfica llamada isoblograma. Esto se efectúa mediante diluciones seriadas de la sustancia en distintas concentraciones de antibiótico y entonces combinando muestras de cada uno de los dos antibióticos a utilizar dispuestos de manera de tablero de ajedrez; teniéndose así los resultados de manera rápida y objetiva para analizar el efecto de los antibióticos en estudio.

Las ventajas clínicas de la quimioterapia con combinaciones de antibióticos se conocen como en el tratamiento de la tuberculosis y en la terapéutica de la endocarditis enterocócica. Las combinaciones se usan a menudo en el tratamiento de otras infecciones intentando explotar al máximo el efecto de los antibióticos.

Cuando se combinan dos agentes antimicrobianos, pueden presentar tres tipos de actividades contra un microorganismo dado in vitro: 1) efecto aditivo a veces denominado efecto indiferente 2) efecto sinérgico y 3) efecto antagónico.

Se dice que dos agentes antimicrobianos son aditivos cuando la actividad en la combinación es igual a la suma, o a una suma parcial, de sus actividades independientes cuando se les estudia por separado. El efecto combinado de un par de antibióticos que presenta sinérgismo es mayor a la suma de sus actividades independientes cuando se les estudia por separado. Si dos agentes antimicrobianos presentan antagonismo, entonces, la actividad de la combinación será menor a la suma de sus efecto independientes cuando se les estudia por separado. Estos conceptos se denotan claramente por las curvas de isobogramas que arroja la elaboración de un tablero de ajedrez antes comentado, y como se ejemplifica a continuación.



Para justificar el uso clínico de las combinaciones de antimicrobianos se proponen algunas razones.

La prevención de las apariciones de microorganismos resistentes parecería una indicación importante para el uso de la combinación de antimicrobianos, esto se ha demostrado en la práctica en algunos padecimientos como la tuberculosis, y la endocarditis estreptococcica, por citar algunos casos.

En las infecciones polibacterianas existe una gran variedad tal de microorganismos que requieren más de un agente antimicrobiano para su tratamiento entre ellas se encuentran las infecciones intraperitoneales y pélvicas debidas a la flora bacteriana mixta intestinal y ciertos abscesos del cerebro.

Como terapia inicial en los pacientes con una supuesta infección cuya naturaleza no es clara, es razonable iniciar el tratamiento con una cobertura de amplio espectro, cabe señalar que en ocasiones resultaría prematuro proponer una aplicación de manera general esta justificación.

El uso de antibióticos que posean acción sinérgica para el tratamiento de infecciones debidas a microorganismos resistentes o relativamente resistentes contituiría una de las razones más atrayentes a la aplicación de la terapia combinada de antimicrobianos.

Muchos de los agentes empleados en la terapia de las infecciones son potencialmente tóxicos, en consecuencia uno de las razones principales del empleo de las combinaciones es reducir la dosis de cada agente necesaria para el tratamiento y de este modo reducir la acción tóxica dependiente de la dosis.

También existen aunque son pocas las desventajas de la utilidad de la terapia combinada de antimicrobianos es importante mencionarlas; las cuales existirían en el caso de la presencia de efectos antagónicos de los medicamentos, teniendo posibles efectos tóxicos por una inapropiada elección de los antimicrobianos a utilizar. También una inadecuada combinación de dosis de los antibióticos tendría posibles efectos adversos, y esto sería por un mal estudio de la sensibilidad del microorganismo infectante.

SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Dado que los diferentes microorganismos varían en su sensibilidad frente a agentes antimicrobianos, es imperativo disponer de algún método para determinar la sensibilidad del microorganismo infectante real. Algunos de ellos son los siguientes:

El método de difusión con discos es el más usado, es simple y relativamente poco costoso, pero proporciona solo datos semicuantitativos o cualitativos de la sensibilidad de un microorganismo dado frente a un agente determinado. No es aplicable a microorganismos de lento crecimiento o muy exigentes, pero de todos modos es un método del que se obtienen datos clínicamente útiles.

Los datos cuantitativos de sensibilidad se obtienen mediante métodos que incorporan diluciones seriadas de antimicrobianos a medios de cultivo con agar o líquidos. La menor concentración del agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible luego de 18 a 24 horas de incubación se denomina Concentración Inhibitoria Mínima (CMI). La Concentración Bactericida Mínima (CBM) o Concentración Letal Mínima (CLM) puede ser determinada mediante pruebas por dilución en caldo, subcultivando en medios con agar sin antibiótico los cultivos que no muestran crecimiento. La menor concentración de antibiótico que suprime totalmente el

crecimiento en un medio libre de antibiótico después de 18 a 24 horas se denomina CLM.

Las técnicas mencionadas anteriormente están basadas en un período de incubación de 18 a 24 horas. El fin primordial de las pruebas por dilución es la obtención de resultados cuantitativos de la sensibilidad, ya que son importantes o necesarios para el tratamiento adecuado de la enfermedad. Aunque los datos cualitativos derivados de las pruebas de difusión con discos son normalmente correctos para orientar la terapéutica de la mayoría de las infecciones, los datos cuantitativos suelen ser imprescindibles cuando debe controlarse la dosificación de las sustancias antimicrobianas o bajo condiciones en las que no sean aplicables los resultados de la difusión con discos, o bien sean equivocados o inseguros. Algunas condiciones son por ejemplo, las pruebas con organismos de lento crecimiento, confirmación de la sensibilidad, y pruebas sobre cepas situadas en la categoría intermedia con un agente antimicrobiano potencialmente tóxico si se considera el tratamiento con dicha sustancia. Las infecciones debidas a microorganismos que se clasifican como resistentes a B-lactámicos relativamente inocuas, en algunas ocasiones pueden ser tratados con amplia seguridad con dosis masivas de uno de estos agentes.

Finalmente, las técnicas por dilución son prácticas y económicas en los procedimientos corrientes de grandes

laboratorios clínicos utilizando técnicas en dilución en caldo y los métodos de dilución en agar con sistemas de inóculo repetido.

FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

En los últimos años en el Hospital de Pediatría del C.M.N. S. XXI la morbilidad y mortalidad ocasionadas por infecciones de Pseudomonas aeruginosa, en pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos, ha ido en aumento.

La mayoría de las infecciones causadas por Pseudomonas aeruginosa pueden ser tratadas con un solo agente antimicrobiano, pero existen indicaciones sobre la utilización del uso de combinaciones de antibióticos. Dado que las combinaciones de antimicrobianos proporcionan un mayor espectro de acción que los antibióticos individualmente, por seguridad se prefiere la utilización de terapias combinadas.

Cuando se combinan dos agentes antimicrobianos, pueden presentar tres tipos de efectos contra el microorganismo:

- 1) efecto aditivo o indiferente,
- 2) efecto sinérgico
- 3) efecto antagónico; y de acuerdo al efecto que tenga la asociación de antibióticos se procede a su terapia antimicrobiana.
(2,4,10,14,15,21)

En el caso de la utilización de beta-lactámicos y el agregado de un aminoglucósido para la terapia antimicrobiana, puede provocar un efecto sinérgico llevando a una proporción de curaciones clínicas

importantes, esta asociación provoca una alteración en la bacteria tal que su muerte es con una dosis menor de antibiótico y menores efectos tóxicos de la terapia para el paciente.

En otros países se han estudiado efectos sinérgicos "in vivo" e "in vitro" entre diferentes beta-lactámicos y aminoglucósidos frente a esta bacteria, así como su resistencia antimicrobiana frente a estos antimicrobianos individualmente.

(6,7,8,9,10,11,13,14,15,19,21,24,25,26)

Basado en observaciones clínicas en el Hospital de Pediatría se emplean combinaciones de Carbenicilina y Amikacina para el tratamiento empírico y terapéutico de infecciones graves ocasionadas por Pseudomonas aeruginosa sin embargo, en nuestro país no se han reportado suficientes estudios de sinergismo bacteriano, siendo de interés conocer su comportamiento "in vitro".

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la toxicidad que presentan altas dosis de antibiótico contra infecciones por Pseudomonas aeruginosa así como su resistencia antimicrobiana en los infantes del Hospital de Pediatría, se pretende demostrar que la combinación "in vitro" de distintas concentraciones de Amikacina y Carbenicilina tienen un efecto sinérgico, sobre cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes de este Hospital.

Justificando así, el uso de terapias antimicrobianas combinadas de éstos antibióticos por distintas razones, como la prevención Pseudomonas aeruginosa resistentes, infecciones polimicrobianas, disminución de la toxicidad de los antibióticos y la elección de la terapia idónea con el uso de agentes antimicrobianos que posean un efecto sinérgico.

OBJETIVO GENERAL

Conocer si existe efecto sinérgico "in vitro" entre Amikacina y Carbenicilina frente a cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes del Hospital de Pediatría del C.M.N. S. XXI.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Carbenicilina y Amikacina por el método de dilución en placa.
- 2.- Determinar por medio de isoblogramas que tipo de efecto (indiferente, sinérgico o antagónico) se observa "in vitro" sobre cepas de Pseudomonas aeruginosa al emplear diferentes mezclas de concentraciones de Amikacina y Carbenicilina, por el método de tablero de ajedrez.
- 3.- Encontrar el efecto máximo de la mezcla de antibióticos por medio del cálculo de la Concentración Inhibitoria Factorial (FIC).

HIPOTESIS

Si la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) "in vitro" por el método de dilución en agar de Carbenicilina y Amikacina es mayor que la CMI combinada de estos antibióticos frente a cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes del Hospital de Pediatría, entonces existe un efecto sinérgico entre éstos antimicrobianos.

MATERIAL

INSTRUMENTOS

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| - Replicador de Steers | E.N.C.B. I.P.N |
| - Balanza analítica | SARTORIUS |
| - Balanza granataria | SARTORIUS |
| - Incubadora 35-37 °C | ENSAMBLES MEXICANOS S.A. |
| - Refrigerador 4°C | KELVINAITOR |
| - Congelador -4°C | AMERICA S.A. |
| - Mechero bunsen | |
| - Autoclave de vapor | FELMEX |
| - Dosificador de líquidos | ECONOMIC |
| - Asas de acero | |

VIDRIERIA

- | | |
|--|------------|
| - Matraz erlenmeyer de 2lt 500ml 125ml | PYREX |
| - Pipeta graduada 20ml 5ml 2ml 1ml | KIMAX |
| - Caja de Petri de vidrio 10X100 | PYREX |
| - Tubo de vidrio con tapón de rosca 18X150 | PYREX |
| - Tubo de vidrio de 5ml | VACUTAINER |
| - Probeta de vidrio 100ml 50ml | KIMAX |

REACTIVOS QUIMICOS

- Base de Agar de Gelosa Sangre con bajo pH BIOXON
- Base de Agar Maconkey DIBICO
- Base de Agar Mueller Hinton BIOXON
- Caldo Mueller Hinton BIOXON
- Sistema API para identificación de
 bacilos no fermentadores MERCK
- Agua bidestilada ELECTROPURA
- Sulfato de Amikacina Pot. 676 mcg/mg
 Lote AKA-S/91108 LAB. PISA
- Carbenicilina Disódica Pot. 797 mcg/mg
 Lote 3875 LAB. SANFER
- Tipibac N para prueba de Oxidasa ONIOX

REACTIVOS BIOLÓGICOS

- 30 Cepas aisladas de pacientes del Hospital de Pediatría
 C.M.N. S.XXI. I.M.S.S.
- Cepa de Pseudomonas aeruginosa 27853 ATCC

METODO

RECOPIACION Y PURIFICACION DE LAS CEPAS

- Recopilar las cepas del congelador registradas como Pseudomonas aeruginosa del cepario del laboratorio de Microbiología del primer semestre de 1993 del Hospital de Pediatría del C.M.N. S. XXI.
- Mantener las cepas por un espacio de media hora a temperatura ambiente.
- Con técnica estéril utilizando mechero bunsen, sembrar por medio de estria cruzada las cepas reunidas en placas de Gelosa Sangre y Agar de Maconkey.
- Incubar las placas 24 hr. a una temperatura de 35-37°C.
- Realizar frotis y tinción de Gram a las cepas aisladas.
- Conservar las cepas teñidas como Gram negativo y crecimiento en agar de Maconkey para su identificación.

IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

- Sembrar por estria cruzada las cepas a identificar en agar de Maconkey.
- Incubar 24 hr. a temperatura de 35-37°C.
- Identificar por sus características bioquímicas las cepas aisladas, utilizando el sistema comercial API para bacilos gram negativos no fermentadores, segun su respectiva técnica.
- Con respecto a los resultados obtenidos en la identificación del carácter bioquímico de la cepas

y por comparación en la tabla que contiene el sistema API, elegir únicamente las cepas identificadas como Pseudomonas aeruginosa, para su posterior estudio.

- Una vez identificadas las cepas llevar un registro propio, así como mantenerlas aisladas y metabólicamente viables en placas de agar de Macconkey.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DE AMIKACINA

- Tocar con el asa estéril de 4 a 5 colonias del microorganismo puro e inocular en un tubo con tapón de rosca de 18X150 conteniendo 10 ml de caldo Mueller Hinton estéril.

- Agitar e incubar a 35-37°C aproximadamente 2 hr. hasta tener una concentración de 0.5 de MacFarland por comparación visual.

- Ajustar en caso de ser necesario diluyendo con caldo Mueller Hinton estéril, hasta la concentración deseada.

- Realizar lo anterior con todas las cepas identificadas.

- Vaciar en el contenedor del replicador de Steers estéril 0.8 ml del inóculo preparado, teniendo un pozo para cada cepa.

- Con el inoculador estéril del replicador de Steers, sumergirlo por espacio de 5 segundos en los pozos.

- Inocular las placas estériles de Agar Mueller Hinton previamente preparadas conteniendo 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 mcg/ml de Amikacina

respectivamente, (tocando la superficie de la placa con el inoculador).

- Incubar las placas de 16-24 hr a 35-37°C.
- Leer el crecimiento de cada cepa como un boton y anotar su resultados.
- Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria de Amikacina para cada cepa, la cuál será la primera Concentración a la que no se halla observado crecimiento de el microorganismo.
- Anotar la CMI de Amikacina de cada cepa.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DE CARBENICILINA

- Tocar con el asa estéril de 4 a 5 colonias del microorganismo puro e inocular en un tubo con tapón de rosca de 18X150 conteniendo 10 ml de caldo Mueller Hinton estéril.
- Agitar e incubar a 35-37°C aproximadamente 2 hr. hasta tener una concentración de 0.5 de MacFarland por comparación visual.
- Ajustar en caso de ser necesario diluyendo con caldo Mueller Hinton estéril, hasta la concentración deseada.
- Realizar lo anterior con todas las cepas identificadas.
- Vaciar en el contenedor del replicador de Steers estéril 0.8 ml del inóculo preparado, teniendo un pozo para cada cepa.
- Con el inoculador estéril del replicador de Steers, sumergirlo por espacio de 5 seg. en los pozos.
- Inocular las placas estériles de Agar Mueller Hinton previamente preparadas conteniendo 0, 0.5, 1, 2,

4, 8, 16, 32, 64, 128, y 256 mcg/ml de Carbenicilina respectivamente, (tocando la superficie de la placa con el inoculador).

- Incubar las placas de 16 - 24 hr a 35-37°C.
- Leer el crecimiento de cada cepa como un boton y anotar sus resultados.
- Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria de Carbenicilina para cada cepa, la cuál será la primera Concentración a la que no se halla observado crecimiento de el microorganismo.

EFFECTO SINERGICO.

- Tocar con el asa estéril de 4 a 5 colonias del microorganismo puro e inocular en un tubo con tapón de rosca de 18X150 conteniendo 10 mL. de caldo Mueller Hinton.
- Agitar e incubar a 35-37°C aproximadamente 2 hrs. hasta tener una concentración de 0.5 de MacFarland por comparación visual.
- Ajustar en caso de ser necesario diluyendo con caldo Mueller Hinton estéril, hasta la concentración deseada.
- Realizar esto con todas las cepas identificadas.
- Vaciar en el contenedor del replicador de Steers estéril 0.8 mL. del inculo, teniendo un pozo para cada cepa.
- Sumergir el inoculador estéril del replicador de Steers, por espacio de 5 segundos en los pozos.
- Con el inoculador de Steers tocar la superficie de las placas de agar Mueller Hinton que contengan las

posibles combinaciones entre las diferentes concentraciones de Amikacina y Carbenicilina (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 mcg/mL. de Amikacina y 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 mcg/mL. de Carbenicilina).

- Incubar las placas de 16-24 hrs. a 35-37°C.
- Anotar la CMI de las combinaciones de los antibioticos para cada cepa.
- Vaciar los resultados de las CMI de cada antibiótico, así como la CMI de las mezclas de los antibióticos en un cuadro con columnas verticales que contendrán todas las diferentes concentraciones de Carbenicilina partiendo de 0; así como las columnas horizontales contendrán todas las diferentes concentraciones de Amikacina de igual manera partiendo de 0 (tablero de ajedrez.)

RESULTADOS

| No DE CEPA | MIC AMIKACINA µg/ml | MIC CARBENICILINA µg/ml | MIC* AKA-CAR µg/ml | FIC |
|------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------|
| 55 | 32 | 64 | 8 16 | 0.5 |
| 139 | 128 | 128 | 32 32 | 0.5 |
| 169 | 16 | 16 | 4 4 | 0.5 |
| 174 | 8 | 16 | 2 4 | 0.5 |
| 247 | 16 | 128 | 8 32 | 0.75 * |
| 298 | 8 | 32 | 1 8 | 0.375 |
| 305 | 16 | 64 | 2 16 | 0.375 |
| 331 | 32 | 64 | 2 16 | 0.312 |
| 360 | 32 | 128 | 4 8 | 0.187 |
| 479 | 128 | 128 | 32 32 | 0.5 |
| 508 | 16 | 16 | 4 4 | 0.5 |
| 510 | 16 | 32 | 4 8 | 0.5 |
| 583 | 4 | 32 | 1 8 | 0.5 |
| 595 | 16 | 32 | 4 8 | 0.5 |
| 621 | 256 | 256 | 64 32 | 0.375 |
| 626 | 128 | 128 | 16 32 | 0.375 |
| 689 | 16 | 128 | 16 416 | 0.735 |
| 735 | 256 | 256 | 16 32 | 0.187 |
| 739 | 16 | 64 | 4 16 | 0.5 |
| 795 | 4 | 16 | 0.5 8 | 0.625* |
| 815 | 16 | 64 | 2 4 | 0.187 |
| 821 | 32 | 128 | 8 32 | 0.5 |
| 910 | 8 | 32 | 2 8 | 0.5 |
| 1055 | 32 | 64 | 4 16 | 0.375 |
| 1067 | 16 | 128 | 4 16 | 0.375 |
| 1081 | 8 | 32 | 2 16 | 0.75 * |
| 1218 | 2 | 32 | 0.5 8 | 0.5 |
| 1219 | 16 | 64 | 4 16 | 0.5 |
| 1332 | 16 | 16 | 4 4 | 0.5 |
| 1345 | 32 | 64 | 4 8 | 0.25 |
| ATCC | 4 | 32 | 1 4 | 0.375 |

$$FIC_{AKA}^{\circ} = \frac{CMI_{AKA}^*}{CMI_{AKA}}$$

$$FIC_{Cb}^{\circ} = \frac{CMI_{Cb}^*}{CMI_{Cb}}$$

$$FIC = FIC_{AKA}^{\circ} + FIC_{Cb}^{\circ}$$

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

AMIKACINA µg/mL.

| µg/ml | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
|-------|--|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|----------------|---|-------|
| 0 | | | | 1218. | ATCC. 583, 795. | 174, 298, 910. | 169, 508, 510. 595, 1219, 1332. 815 | 1345. |
| 0.5 | | | | | | 815. | | |
| 1 | | | 1218 | ATCC. | | 1081. 1332. | | |
| 2 | | | | 583. | 174. 815. | 169, 508, 595. | | |
| 4 | | | ATCC | 174, 795. 815 | 169, 298, 508. 910, 1332. | 510, 1219. | 1345. | |
| 8 | | 795, 1218 | 298, 583, 174. 815. | 169, 910, 508. 1332 | 510, 595, 1345. | | | |
| 16 | 169, 174, 508. 795, 1332. | 298. 583. ATCC. | 510, 910. | 595. 1345. | 1219. | | | |
| 32 | ATCC. 298, 510. 583, 595, 910. 1218. | 815. | 1345 | 1219. | | | | |
| 64 | 1219, 1345. 815. | | | | | | | |

C
A
R
B
E
N
I
C
I
L
I
N
A

µg/ml

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

AMIKACINA µg/mL.

| µg/mL | 0 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
|-------|--|--------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|-----------|
| 0 | | | | 1081. | 247, 305, 689. 739, 1067. | 55, 331, 360. 821, 1055. | | 139, 479, 626. | 621, 735. |
| 4 | | | | 305. | 55, 331. 360, 821. 1055. | | | 735. | |
| 8 | | | 360, 305, 1081. | 689, 331, 1055. 1067, 739. | | | 479, 626, 735. | | |
| 16 | | 305, 331, 1081 | 739, 1067, 1055. 689. | 55. | | 626, 735. | 139. | 621. | |
| 32 | 1081 | 739, 1055. 360. | 55 | 247, 821. | 626, 735. | 479, 139. | 621. | | |
| 64 | 55, 305, 331, 739, 1055. | 1067, 689. | 247. | 626, 735. | 139, 479. | | | | |
| 128 | 139, 247, 360. 479, 626, 689. 821, 1067. | | 735. | | | 621. | | | |
| 256 | 621, 735. | | | | | | | | |

C
A
R
B
E
M
I
C
I
L
I
N
A

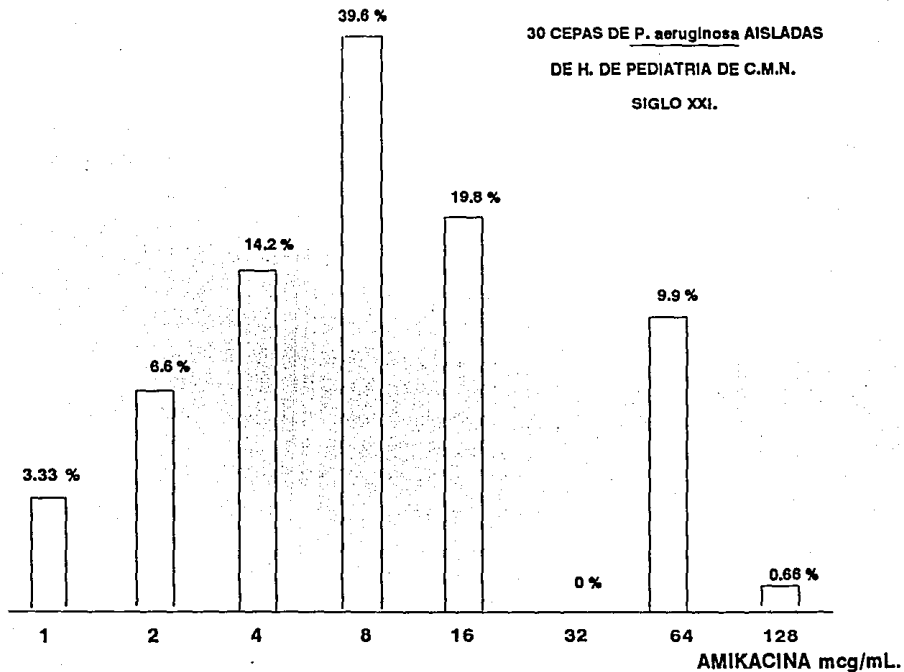
µg/mL

% RESISTENCIA DE P. aeruginosa AISLADAS

30 CEPAS DE P. aeruginosa AISLADAS

DE H. DE PEDIATRIA DE C.M.N.

SIGLO XXI.

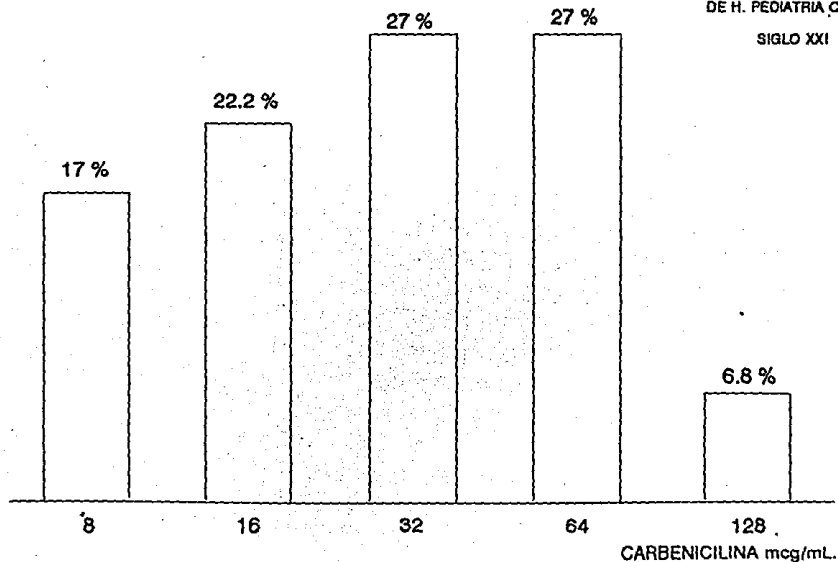


% RESISTENCIA DE P. aeruginosa AISLADAS

30 CEPAS DE P. aeruginosa AISLADAS

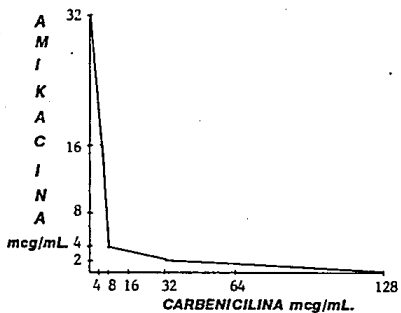
DE H. PEDIATRIA C.M.N.

SIGLO XXI

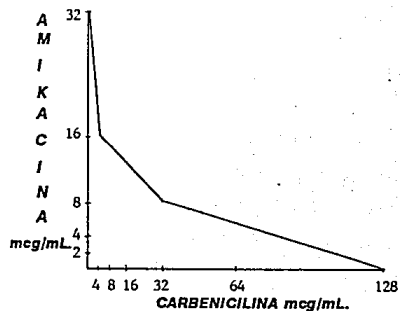


ISOBOLOGRAMAS

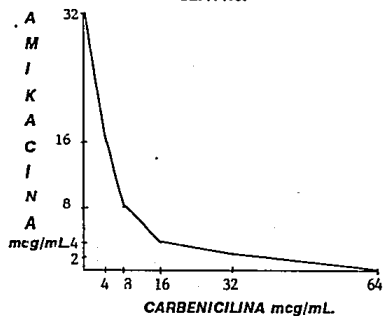
CEPA No. 360



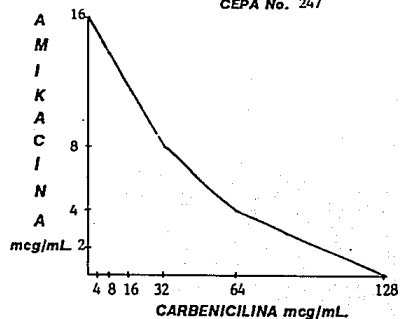
CEPA No. 821



CEPA No. 1055

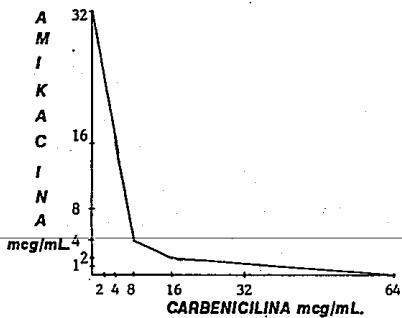


CEPA No. 247

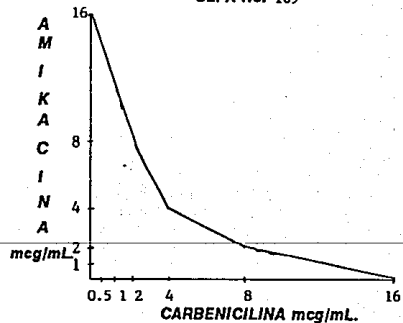


ISOBOLOGRAMAS

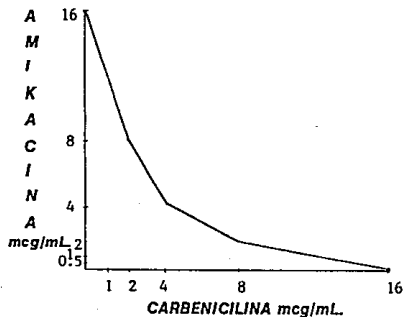
CEPA No. 1345



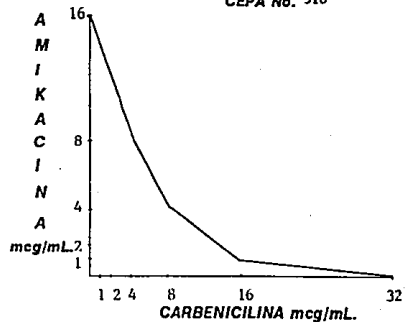
CEPA No. 169



CEPA No. 508

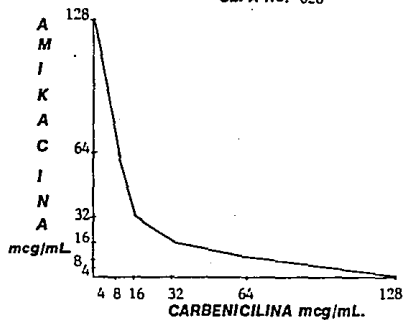


CEPA No. 510

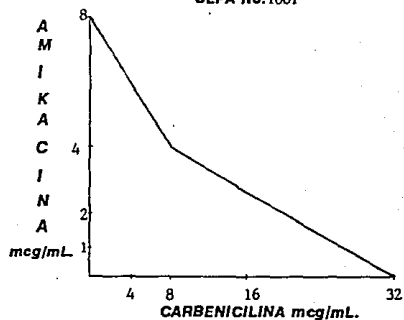


ISOBOLOGRAMAS

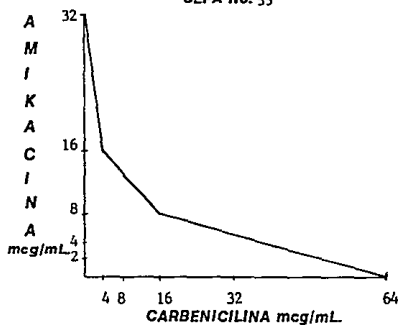
CEPA No. 626



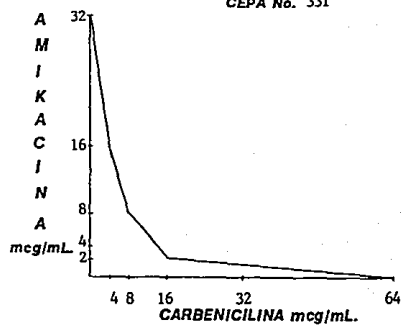
CEPA No. 1081



CEPA No. 55

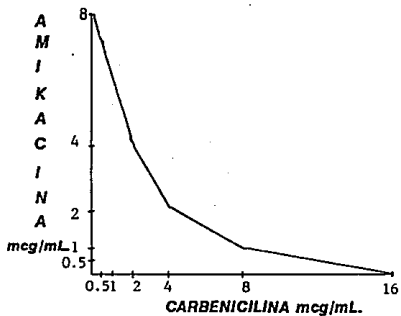


CEPA No. 331

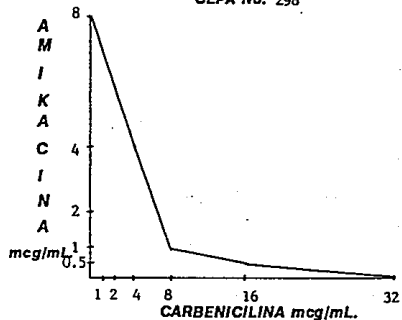


ISOBOLOGRAMAS

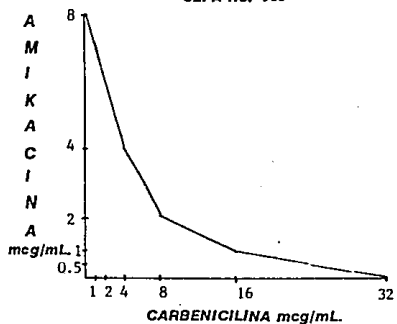
CEPA No. 174



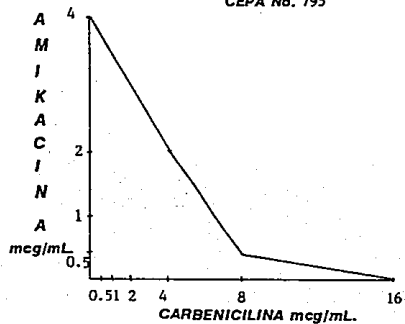
CEPA No. 298



CEPA No. 910

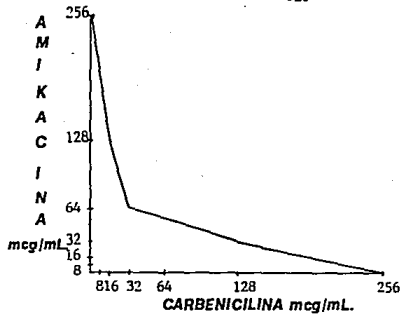


CEPA No. 795

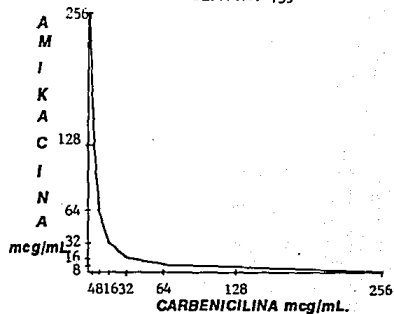


ISOBOLOGRAMAS

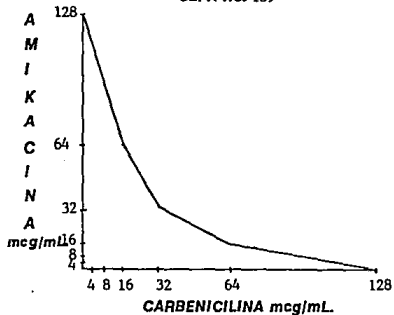
CEPA No. 621



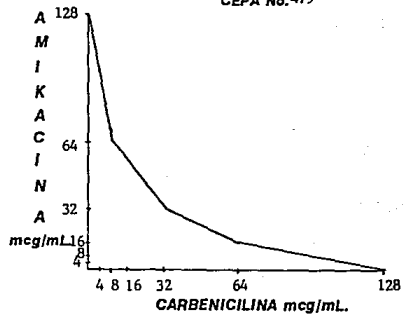
CEPA No. 735



CEPA No. 139

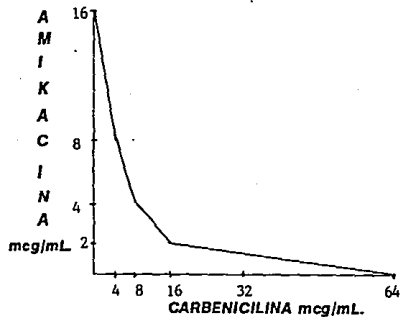


CEPA No. 479

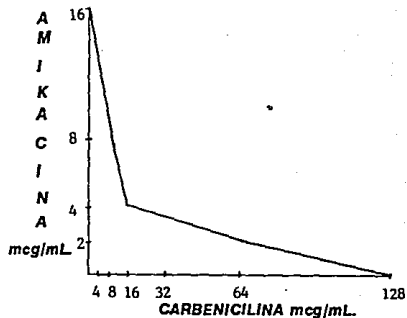


ISOBOLOGRAMAS

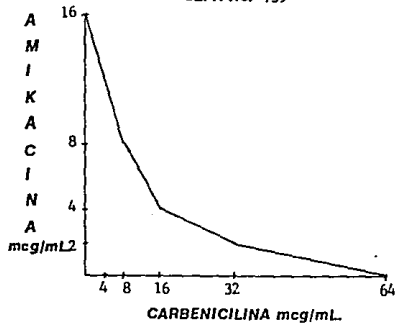
CEPA No. 305



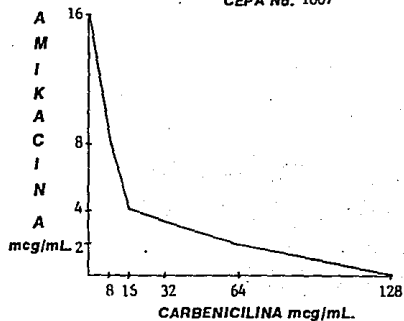
CEPA No. 689



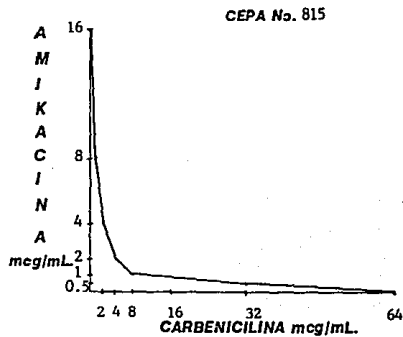
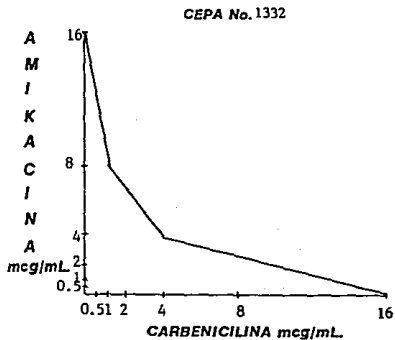
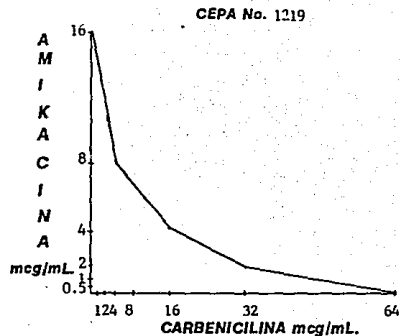
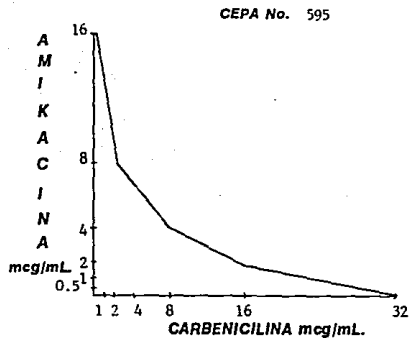
CEPA No. 739



CEPA No. 1067

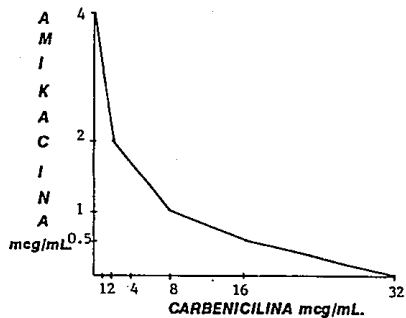


ISOBOLOGRAMAS

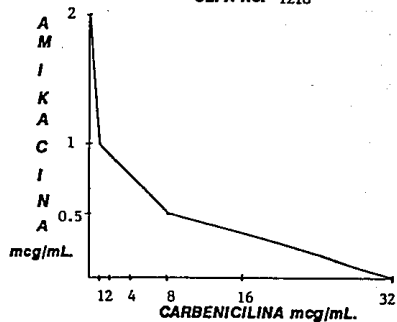


ISOBOLOGRAMAS

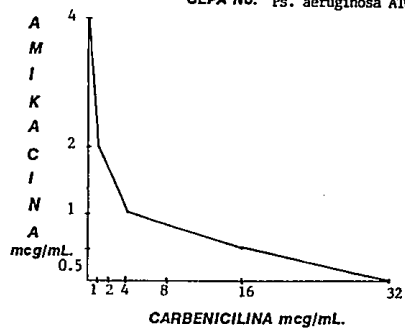
CEPA No. 583



CEPA No. 1218

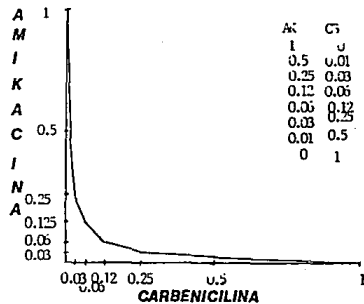


CEPA No. Ps. aeruginosa ATCC

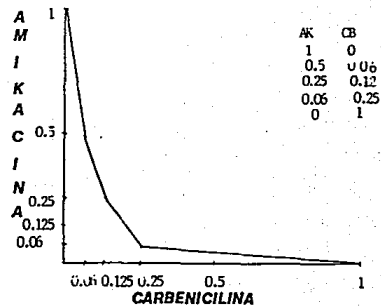


CONCENTACION FACTORIAL INHIBITORIA

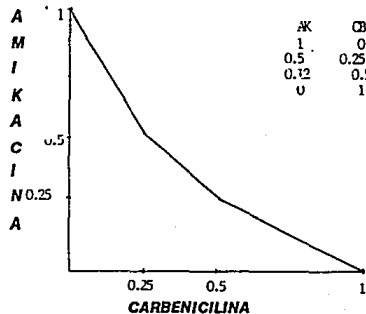
CEPA No. 735



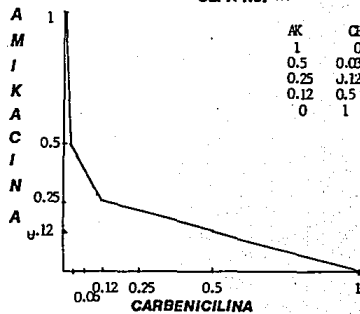
CEPA No. 331



CEPA No. 247



CEPA No. ATCC



DISCUSION DE RESULTADOS

Con respecto a los resultados obtenidos en la tabla I y II la cuales se refieren a la incidencia en la resistencia de las cepas de Pseudomonas aeruginosa frente a Amikacina y Carbenicilina de una manera independiente presentan una mayor incidencia frente a la Carbenicilina en comparación con la Amikacina.

Es importante hacer notar que existieron cepas con una alta incidencia en la resistencia a estos antimicrobianos lo cual es de gran importancia clínica, ya que por la terapia necesaria para erradicar una infección en los infantes por este microorganismo en el paciente se tendrían probables efectos tóxicos indeseables.

(1,3,4,5,7,8,9,12)

La resistencia bacteriana de las cepas estudiadas, tienen una mayor incidencia frente a Carbenicilina, esto, probablemente a la presencia de enzimas constitutivas de la bacteria (B-lactamasas), las cuales se ha comprobado inactivan la acción del antibiótico sobre las bacterias en estudio, además de la probable existencia de una mutación genética en la replicación; otro aspecto importante en relación a la resistencia de las cepas estudiadas en comparación con otros países (E.U.) se tiene que existe por lo menos en una concentración más alta en nuestro estudio, esto gracias a circunstancias tal como al abuso indiscriminado en nuestro país de los antibióticos, así como de factores como

higiene, tipo de alimentación, genética, educación etc..
(1,4,6,7,8,9,10,11,12,14,16,19)

En el tablero de ajedrez (tabla III,IV), se muestran los resultados de las diferentes Concentraciones Mínimas Inhibitorias con los dos antibióticos para cada de las cepas así como las diferentes MIC posibles de las distintas combinaciones de las concentraciones de Amikacina y Carbenicilina para cada cepa en estudio.
(6,8)

Los isobogramas obtenidos con los datos del tablero de las cepas aisladas denotan el tipo de comportamiento que tuvieron los antibióticos en el estudio. Obteniendo con esto un efecto sinérgico del 90% de las cepas estudiadas (27 cepas).

Con respecto a la obtención de la Concentración Inhibitoria Factorial (FIC) se denota en los isobogramas que es la concentración combinada óptima de Amikacina y Carbenicilina para cada cepa aislada, observándose en estas concentraciones el efecto sinérgico, teniendo en cuenta que valores con un $FIC < 0.5$ existe un efecto sinérgico, $FIC > 0.5 > 1$ existe un efecto indiferente y un valor de $FIC > 1$ existe un efecto antagónico; además con los datos obtenidos del cálculo de la FIC se ejemplificaron cuatro de las cepas en estudio realizando un gráfico que elimina el error logarítmico en los isobogramas teniendo gran similitud con éstos, teniendo otro tipo de visión del efecto sinérgico existente en este estudio.
(1,3,7,8,9,10,11,12,13,17,18,19,20,21)

Cabe señalar que dentro de este estudio el control de variables como las concentraciones de iones Mg^{++} y Ca^{++} fueron controlados dentro de lo establecido por la NCCLS*, por interferir directamente en la sensibilidad antimicrobiana de las cepas frente a Amikacina, ya que existe un efecto antagónico entre estos.

(9,10,12,14,17,20)

El efecto sinérgico observado entre Amikacina y Carbenicilina frente a las cepas de Pseudomonas aeruginosa difiere con la literatura actual ya que en este estudio existió una mayor resistencia del microorganismo a éstos antibióticos, en cuanto al porcentaje del efecto sinérgico en comparación con la literatura es muy cercana a esta, la cual es del 93%.

(13,14,15,16,17,18,19,23,25,27,28)

Finalmente en el estudio realizado se observa efecto sinérgico entre Amikacina y Carbenicilina frente a cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes de Hospital de Pediatría, teniendo con esto que la Concentración Mínima Inhibitoria independiente es mayor que la Concentración Mínima Inhibitoria combinada, con lo cual la Hipótesis planteada es aceptada.

*National Control Laboratory Society.

CONCLUSIONES

Con la realización de este estudio se apoya de manera clara el uso de la terapia combinada con Amikacina y Carbenicilina para infecciones por P. aeruginosa en infantes; pudiéndose hacer extensivo para otro tipo de poblaciones con la obligada observación clínica.

Por ser una de las primeras investigaciones en esta área en la modernidad del Hospital de Pediatría, este tipo de estudio puede ser aplicado para otras bacterias que tengan una alta incidencia de infecciones hospitalarias.

Siendo este un estudio de la investigación de la existencia de un efecto sinérgico entre Amikacina y Carbenicilina sobre cepas de Pseudomonas aeruginosa se puede concluir que existe dicho efecto y que el objetivo de este estudio es aceptado.

Finalmente dentro de los beneficios de la existencia de efecto sinérgico de Amikacina y Carbenicilina contra Pseudomonas aeruginosa (medicamentos de primera elección en el Hospital de Pediatría) se encuentra la disminución de los efectos tóxicos que ocurren por administración de altas dosis de éstos antibióticos, así como disminución del costo de la terapia antibacteriana, del tiempo de hospitalización y la prevención del aumento de la resistencia bacteriana.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lennette H. Edwin "Manual de Microbiología Clínica" Ed. Salvat Editores. Barcelona España. 1981.
- 2.- Faddin Mac J.F. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia clínica. 1a. reimp. Ed. Médica Panamericana S.A. México, D.F. 1990.
- 3.- Balows Albert. Manual of Clinical Microbiology. American Society Microbiology. Washington D.C. U.S.A. 1991.
- 4.- Koneman W. Elmer "Diagnóstico Microbiológico" 3a. ed. Ed. Panamericana Mex. D.F. 1991.
- 5.- Bowman W.C. y Rand M.J. "Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas" 2a. ed. Ed. Interamericana Mex. D.F. 1985.
- 6.- Young s. Lowell. 1971. Gentamicin: Clinical Use with Carbenicillin and In-Vitro Studies with Recent Isolates of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 124:S202-S206.
- 7.- Andriole t. Vicent. 1971. Synergy of Carbenicillin and Gentamicin in Experimental Infection with Pseudomonas. J. Infect. Dis. 124:546-557.
- 8.- Hooton M.T. and Counts W.G. 1984. Synergism at Clinically Attainable Concentrations of Aminoglycoside and Beta-Lactam Antibiotics. Antimicrob. Agents. Chemother. 26:535-538.
- 9.- Kurtz T. and William M. 1981. Comparative in Vitro Sinergic Activity of New Beta-Lactam Antimicrobial Agents and Amikacin Against Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens. 20:239-243.
- 10.- Wu D. Baltch and Smith R. 1984. In Vitro Comparison of Pseudomonas Isolates with various Suceptibles to Aminoglycosides and ten Beta-lactam Antibitics. Antimicrobs. Agents. Chemoter. 25:488-490.
- 11.- Giamerellou Helen. 1984. In Vitro Sinergic Activities of Aminoglycosides and New Beta - Lactams Against Multiresistant Pseudomonas aeruginosa. 25:534-536.

- 12.- Rybak J. Michael. 1992. Pharmacodynamics of Once-Daily Amikacin in Various Combinations with Cefepime, Aztreonam, and Ceftazidime against Pseudomonas aeruginosa in an In Vitro. Infection Model. Antimicrob. Agents. Chemoter. 36:2741-2746.
- 13.- Giamarellou Helen. 1986. Aminoglycosides plus Beta-Lactam against Gram-Negative Organisms. Am. J. Med. 80:126-137.
- 14.- Barclay M.L. 1992. Adaptive Resistance Following Single Doses of Gentamicin in a Dynamic In Vitro Model. Antimicrob. Agents. Chemoter. 36:1951-1957.
- 15.- Reguera J.A. 1990. B-Lactam-Fosfomicin Antagonism Involving Modification of Penicillin-Binding Protein 3 in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents. Chemoter. 34:2093-2096.
- 16.- Gordon C.A. and Hodges N. 1991. Use of Slime Dispersants To Promote Antibiotic Penetration through the Extracellular Polysaccharide of Mucoid. Antimicrob. Agents. Chemoter. 35:1258-1260.
- 17.- Joyce L.F. Comparison of the Sceptor Pseudomonas Plus MIC Panel with Agar Dilution for Susceptibility Testing of Pseudomonas aeruginosa. J. Clinical. Microbiology. 30:2714-2716
- 18.- Zimetis V. and Jackson G. 1973. Activity of Aminoglycoside antibiotic against Pseudomonas aeruginosa: Specificity and site of Calcium and Magnesium antagonism. J. Infect. Dis. 127:663-669.
- 19.- Andriole T. V. 1974. Antibiotic Synergy in Experimental Infection with Pseudomonas . J. Infect. Dis. 129:124-133.
- 20.- Reller B. and Sherris J. 1974. Antibiotic Susceptibility Testing of Pseudomonas aeruginosa: Selection of Control Strain and Criteria for Magnesium and Calcium Content in Media. J. Infect. Dis. 130:454-463.
- 21.- Holmes R. and Sanford J. 1974. Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Aminoglycoside Antibiotics. J. Infect. Dis. 130:S163-S166.

- 22.- Hancock Robert. 1984. Use of the Fluorescent Probe 1-N-Phenyl-naphthylamine to Study the Interactions of Aminoglycoside antibiotics with the outer Membrane of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents. Chemother. 26:546-551.
- 23.- Kunce D. and Torres L. 1986. Do Calcium Antagonist Act Directly on Calcium Channels to Alter Baroreceptor Function?. J. Pharm. Exp. Therap. 239:303-310
- 24.- Cobbs Gleinn. 1986. In Vitro Activity of Piperacillin, Ticarcillin, and Mezlocillin alone and in Combination with Aminoglycoside against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents. Chemother. 30:25-30.
- 25.- Verbist L. 1986. In Vitro activity of Pefloxacin against micro-organisms multiply resistant to Beta-Lactam antibiotics an aminoglycosides. J. Antimicrob. Chemother. 17:SB11-SB17.
- 26.- Bustamante Carlos. 1990. In Vitro Activity of Ciprofloxacin in Combination with Ceftazidime, Aztreonam, and Azlocillin against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents. Chemother. 34: 1814-1815.
- 27.- Barclay M.L. 1992. Adaptive Resistance Following Single Doses of Gentamicin in a Dynamic In Vitro Model. Antimicrobiology Agents. Chemother. 36: 1951-1957.
- 28.- Joyce L.F. 1992. Comparison of the Sceptor Pseudomonas Plus MIC Panel with Agar Dilution for Susceptibility Testing of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents. Chemother. 30: 2714-2716.
- 29.- Joyce L.F. 1992. Comparison of Five Methods, Including the Epsilonometer Test, for Antimicrobial Susceptibility Testing of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial. Agents. Chemother. 30: 2709-2714.